通过尿蛋白质组发现无表型基因修饰动物的改变[1]

华元瑞　郭晓甜　高友鹤*

（北京师范大学生命科学学院基因工程药物及生物技术北京市重点实验室，北京 100875）

*通讯作者：gaoyouhe@bnu.edu.cn

摘要：

[目的] 尿液能够不受机体内环境稳态机制的调节，接收来自机体的代谢废物，从而能够实现对变化的敏锐监测，尿液蛋白质组具有灵敏反应机体变化的潜力。基因敲除是探究基因功能的有效方式。在实际工作中，某些基因的敲除对生物体的表型并未产生明显影响。

[方法] 本研究通过对两组功能未知基因敲除小鼠尿液样本（命名为 GeneA 组与 GeneB 组）与相应对照组样本进行质谱分析，对其差异蛋白进行生物学过程富集。

[结果] 结果表明 GeneA 与代谢相关；GeneB 组与代谢以及细胞形态的构造相关，并探讨了其可能发挥影响的机制。

关键词： 基因敲除　无表型　尿液蛋白质组学

分类号： Q6

Discover changes in non-phenotype Genetically modified animals through urinary proteome

Hua Yuanrui　Guo Xiaotian　Gao Youhe*

(Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory,College of Life Sciences，Beijing Normal University，Beijing 100875)

*Corresponding author: gaoyouhe@bnu.edu.cn

Abstract:

[Objective] Urine can not be regulated by the homeostasis mechanism and can collect metabolic waste from the body, thereby enabling sensitive monitoring of changes. Urinary proteome has the potential to sensitively respond to changes in the body. Gene knockout is an effective way to explore gene function. In actual work, the knockout of certain genes did not have a significant impact on the phenotype of the organism..

[Methods] In this study, two groups of urine samples of knockout mice with unknown function (named GeneA group and GeneB group) and the corresponding control group were analyzed by mass spectrometry, and their differential proteins were enriched in biological processes.

---

1 本研究受国家重点研发计划(2018YFC0910202 及 2016YFC1306300)；中央高校基本科研业务费专项资金(2020KJZX002)；北京市自然科学基金(7172076)；北京合作研究项目(110651103)；北京师范大学基金(11100704)；北京协和医院基金(2016-2.27)资助。

[Results] The results showed that GeneA is connected with metabolism，GeneB group is related to metabolism and the structure of cell morphology, and the possible mechanisms of these influence was discussed.
Keywords： Gene konck-out Non-phenotype Urinary proteome

前言

尿液作为一种无创易获取的生物液体，正逐渐地成为临床疾病的生物标志物研究之中的理想样本，被广泛运用于临床疾病的早期的诊断和状态预测中[1]。尿液不受机体内环境稳态机制的调节，接收来自机体的代谢废物，因而能够在疾病早期反映生物体本身的变化，在大鼠颅内胶质母细胞瘤模型中，在核磁共振尚未发现明显差异的时间点，尿液蛋白质组已发生显著变化[2]。此外，尿液在形成过程中能够对代谢废物进行富集，从而起到信号放大器的作用，从而能够实现对变化的敏锐监测，研究表明即使皮下接种约 10 个肿瘤细胞，尿液蛋白质组也会产生差异[3]。

基因敲除技术实际上是一种将外源性的 DNA 导入目标个体的技术。在基因敲除的工作中，将含有已知序列的 DNA 片段与受体细胞基因组中相同的或相似的序列的基因进行同源重组，然后整合到受体细胞的基因组中并表达。这是一种能够改变生物体基因的技术，针对序列已知但是功能未知的序列，将基因的功能敲除，从而阻断一部分功能，进一步对生物体产生，导致基因的生物功能无法正常发挥，根据生物体所表现出来的状态推测该基因的生物学功能[4]。目前基因敲除这一项技术已经被广泛地应用于探讨基因功能的相关研究之中。例如，利用基因敲除技术可以明确一些重要的功能微生物的全基因组，还能够准确地定位功能基因[5]。然而，在实际工作中，某些基因的敲除对生物体的表型并没有明显的影响[6]，敲除的基因的具体功能无法从生物体的表型中得出结论，这为基因敲除工作增添了一定的难度。在本研究中，我们拟通过尿液蛋白质组这一灵敏的检测方式，来探究被敲除的基因对机体产生的影响以及可能的作用机制。在敲除基因未知的情况下，可以推测出被敲除的基因具体的作用和类别。

本研究对中国医学科学院医学实验动物研究所提供的基因敲除小鼠的尿液样本（基因未知），利用数据非依赖型采集（DIA）获取数据，分析尿液蛋白质组并筛选差异蛋白。依据差异蛋白富集到的的产生显著变化的生物学过程，判断被敲除的基因对实验组小鼠产生的影响，以此探究被敲除的基因对小鼠的作用，为相关研究提供了一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 尿液样本收集

基因敲除后无表型小鼠尿液样本由中国医学科学院医学实验动物研究所提供，共计有编号为 GeneA-WT-1、GeneA-WT-2、GeneA-KO、GeneB-WT 及 GeneB-KO 的五组混合样本（基因具体的功能与名称不明）。即 GeneA 基因敲除实验组与对照组分别为一组和两组样品，GeneB 基因敲除实验组与对照组分别为一组样品。

1.2 乙醇沉淀法提取尿蛋白

将收集到的尿液提前解冻，在 4℃、3000 g 条件下离心 30 min，取上清并转移至新的 EP 管，然后 4℃、12000 g 继续离心 40 min，取上清液，将细胞碎片以及颗粒物沉淀去除。将上清液与体积为上清液三倍的预冷乙醇转移到新的 EP 管中，置于-20℃条件下过夜。在 4℃、12000 g 条件下将过夜样品离心 30 min，弃上清后用使沉淀风干。用裂解液重悬沉淀物，完全溶解混匀后，在 4℃、12000 g 条件下离心 30 min，取上清液，将其置于-80℃保存。然后使用 BCA 法测定蛋白的浓度。

1.3 尿液蛋白酶解并收集肽段

使用滤器辅助的蛋白质酶解方法（FASP）[7]，在膜上辅助酶解尿液蛋白质。使用 UA 溶液（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 为 8.5）清洗 10 kD 超滤管后，将每一个样本各取 100 μg 蛋白加到 10 kD 滤膜上，依次用 UA 溶液和 ABC 溶液（50 mmol/L 的 NH4HCO3 溶液）清洗两次和一次尿液蛋白质样品。加入 100 μL 25 mM ABC 重悬蛋白质，加 1 M DTT 3 μL 至终浓度为 20 mM，在 37℃条件下水浴 1 h 还原蛋白质。加入现配 1 M IAA 至终浓度为 50 mM ，避光反应 40 min，使蛋白质的二硫键烷基化。依照 w（蛋白质）：w（酶）= 1：50 的比例加入胰蛋白酶，高火微波 1 min 后，在 37℃条件下水浴过夜。在 4℃、12000 g 条件下将样品离心 30min，收集肽段。

1.4 用 Oasis HLB 固相萃取柱除盐

向肽段中加入 100 μL ABC 溶液重悬，在 4℃、12000 g 条件下离心 30 min。向萃取柱依次加入 1 mL 甲醇和 1 mL 乙腈进行活化，然后加入 1 mL 千分之一甲酸两次进行平衡，再将所有肽段样品全部加入标有对应序号的萃取柱中。依次加入千分之一甲酸共计 6 次进行除盐后，用 900 μL 乙腈洗脱样品，用真空干燥仪干燥样品后于-80℃条件下保存。

1.5 高 pH 反相色谱预分离

酶切后的样品用 0.1%甲酸水重溶，并稀释到 0.5 μg/uL，取每个样品制备混合多肽样，使用高 pH 反相肽段分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司)进行分离。将混合多肽样品加于色谱柱上，用乙腈浓度梯度递增的溶液进行洗脱，通过离心收集十份流出液，使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。本次研究使用 iRT 合成多肽（Biognosis 公司），以 10：1 的体积比例加入到十个组分和每个样品中。

1.6 高效液相串联质谱数据采集

使用 EASY-nLC 1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行质谱采集和分析。将肽段样品加载到预柱（75 μm×2 cm,C18, 2 μm, Thermo Fisher）和反相分析柱（50 μm×15 cm, C18, 2 μm, Thermo Fisher），以 400 nL/min 流速进行洗脱，洗脱时间为 120 分钟，洗脱用梯度为 4%-35%的流动相 (80%乙腈+0.1%甲酸+20%水)。参数设置如下：喷雾电压 2.4 kV,一级全扫描范围为 350-1550 m/z,分辨率 60000；二级扫描范围为 200-2000 m/z，分辨率 30000，循环时间 3 s，最高速度模式，30% HCD 碰撞能量。

1.7 质谱数据分析

将反相色谱柱分离得到的 10 个组分进行 DDA 模式采集质谱数据，把 DDA 采集的结果导入 Proteome Discoverer 软件（版本 2.1）搜库，参数：小鼠数据库（2019 年发布，含 17038 条序列）附加 iRT 多肽序列，胰酶酶切，最多允许两个漏切位点，母离子质量容差 10 ppm，碎片离子质量容差 0.02 Da,甲硫氨酸氧

化为可变修饰，固定化修饰为半胱氨酸的氨酰甲基化修饰，蛋白 FDR 设置为 1%。PD 搜库结果用于建立 DIA 采集方法，根据 m/z 分布密度计算窗口宽度和数量。将单个多肽样品进行 DIA 模式采集质谱数据。

使用 Spectronaut X 软件（Biognosys, Switzerland）对质谱数据进行处理和分析[8]。根据 DDA 搜库结果 pdResult 文件与 10 个 DDA raw 文件建立谱图库，导入每个样品 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。高度可信蛋白标准为肽段 q value<0.01，采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

1.8 统计分析与生物信息学分析

每一个样品均进行了三次技术重复，将获得的数据其用于统计学分析。将实验组与对照组鉴定出的尿蛋白进行对比，进行差异蛋白筛选。筛选差异蛋白的条件如下：双尾配对 t 检验 $p<0.05$，并且变化倍数≥1.5 或≤0.67。

使用 Uniprot 查询差异蛋白的名称及功能；使用 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/)对最终筛选出来的差异蛋白进行生物学功能富集；使用 SRING 数据库进行蛋白互作网络分析（https://string-db.org/cgi/input.pl），并用 Cytoscape 软件（版本 3.7.1）[9]进行后续处理。

2 结果

2.1 层聚类分析

对缺失值填充[10]后的总鉴定结果进行非监督聚类分析，聚类结果能够很好的把不同基因的组别区分开来（图 1），表明尿液蛋白质组不仅有区分基因敲除与否的潜力，还有着区分敲除不同基因的潜力。

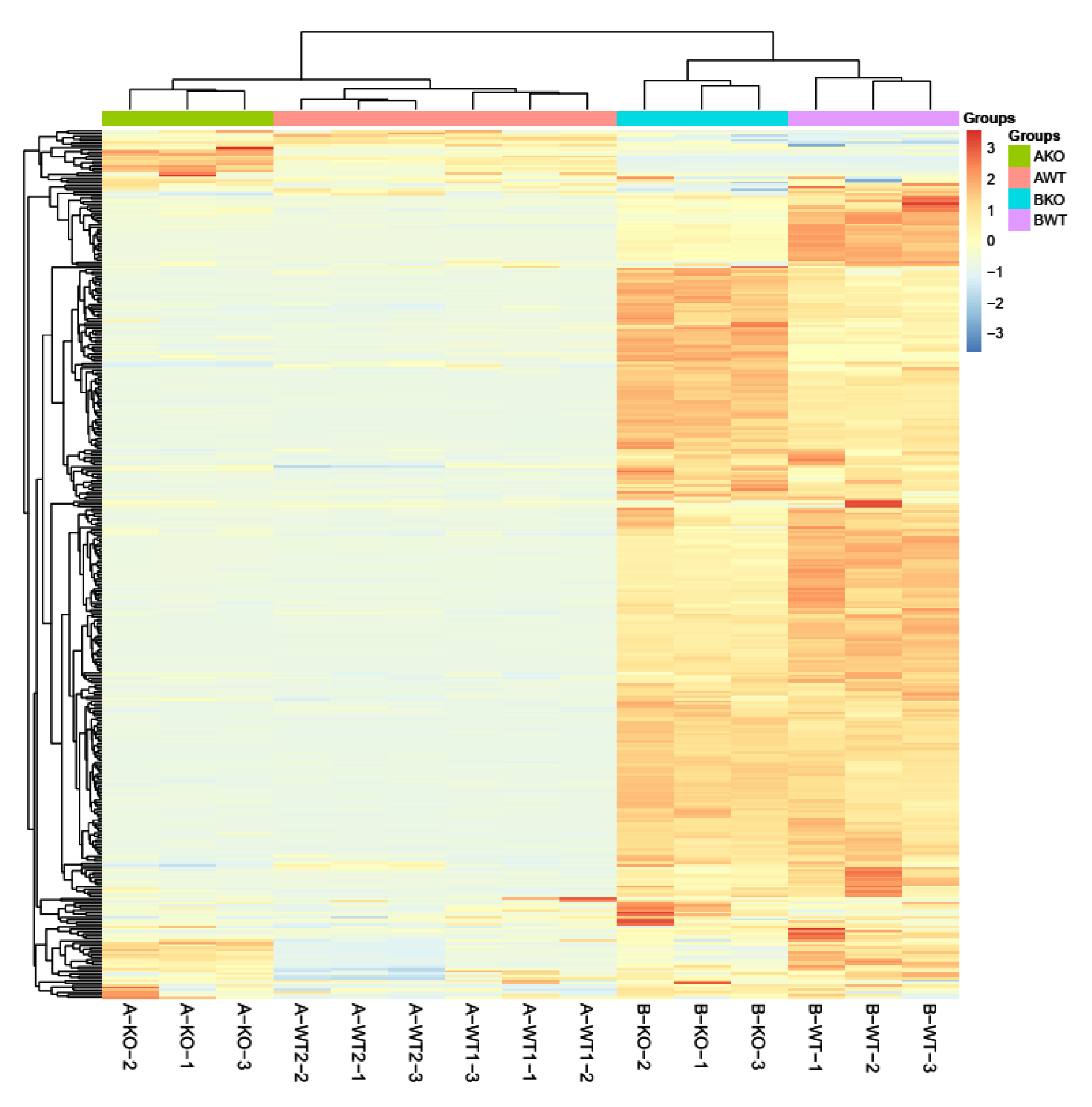


图 1.全蛋白非监督聚类结果。

2.2 GeneA 组小鼠尿液蛋白质组的变化

对于基因敲除 GeneA 组的小鼠，共收集实验组样本一组、对照组样本两组，每组样本以 DIA 模式采集数据三次。实验组样本平均鉴定到 539 种蛋白，对照组样本分别平均鉴定到 605 种和 659 种蛋白，对比筛选出 48 种差异蛋白（表 1）。蛋白互作网络图表明（图 2），Gc、Serpinf2、Hp 和 Mug1 四个基因与其他基因的联系较为密切。

表 1.基因敲除 GeneA 组差异蛋白。

UniProt Accession	Protein Name	Gene Name	Fold Change	P-value

P28666	Murinoglobulin-2	Mug2	19.96	0.0218
P24638	Lysosomal acid phosphatase	Acp2	12.97	0.0000
Q9D3H2	Odorant-binding protein 1a	Obp1a	11.82	0.0000
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Slc9a3r1	11.00	0.0371
P23780	Beta-galactosidase	Glb1	10.59	0.0240
P01660	Ig kappa chain V-III region PC 3741/TEPC 111	N/A	9.41	0.0000
Q61282	Aggrecan core protein	Acan	6.36	0.0000
P97384	Annexin A11	Anxa11	5.35	0.0371
P63260	Actin, cytoplasmic 2	Actg1	5.23	0.0184
Q9D7Z6	Calcium-activated chloride channel regulator 1	Clca4a	5.18	0.0021
Q80XI7	Vomeromodulin	Bpifb9a	4.98	0.0006
P11591	Major urinary protein 5	Mup5	4.93	0.0000
P51855	Glutathione synthetase	Gss	4.68	0.0015
P01662	Ig kappa chain V-III region ABPC 22/PC 9245	N/A	4.46	0.0000
Q61247	Alpha-2-antiplasmin	Serpinf2	4.44	0.0007
A2AEP0	Odorant-binding protein 1b	Obp1b	4.24	0.0001
P28665	Murinoglobulin-1	Mug1	3.90	0.0237
Q5FW60	Major urinary protein 20	Mup20	3.80	0.0002
P26262	Plasma kallikrein	Klkb1	3.59	0.0144
Q02013	Aquaporin-1	Aqp1	3.55	0.0427
Q61490	CD166 antigen	Alcam	3.43	0.0010
Q60825	Sodium-dependent phosphate transport protein 2A	Slc34a1	3.41	0.0001
Q62468	Villin-1	Vil1	3.40	0.0051
Q7M6Z0	Reticulon-4 receptor-like 2	Rtn4rl2	3.39	0.0342
P01630	Ig kappa chain V-II region 7S34.1	N/A	2.90	0.0035
Q61838	Pregnancy zone protein	Pzp	2.85	0.0047
Q9R069	Basal cell adhesion molecule	Bcam	2.81	0.0051
P29788	Vitronectin	Vtn	2.81	0.0205
Q61646	Haptoglobin	Hp	2.68	0.0175
B5X0G2	Major urinary protein 17	Mup17	2.58	0.0015
E9Q557	Desmoplakin	Dsp	2.37	0.0014
Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1	Enoph1	2.33	0.0099
Q8BND5	Sulfhydryl oxidase 1	Qsox1	2.31	0.0012
P11588	Major urinary protein 1	Mup1	2.27	0.0106
O09159	Lysosomal alpha-mannosidase	Man2b1	2.22	0.0373
Q02257	Junction plakoglobin	Jup	2.19	0.0004
O08539	Mycbox-dependent-interacting protein 1	Bin1	2.18	0.0408
P27773		Pdia3		

P01029	Protein disulfide-isomerase A3	C4b	2.17	0.0157
P20060	Complement C4-B	Hexb	2.07	0.0050
Q60648	Beta-hexosaminidase subunit beta	Gm2a	0.48	0.0017
Q61090	Ganglioside GM2 activator	Fzd7	0.48	0.0313
Q9DC11	Frizzled-7	Plxdc2	0.46	0.0407
O70362	Plexin domain-containing protein 2	Gpld1	0.43	0.0087
	Phosphatidylinositol-glycan-specific		0.42	0.0095
P21614	phospholipase D	Gc		
P70158	Vitamin D-binding protein	Smpdl3a	0.41	0.0134
	Acidsphingomyelinase-like		0.34	0.0392
Q8K2I4	phosphodiesterase 3a	Manba		
P11590	Beta-mannosidase	Mup4	0.25	0.0001
	Major urinary protein 4		0.17	0.0150

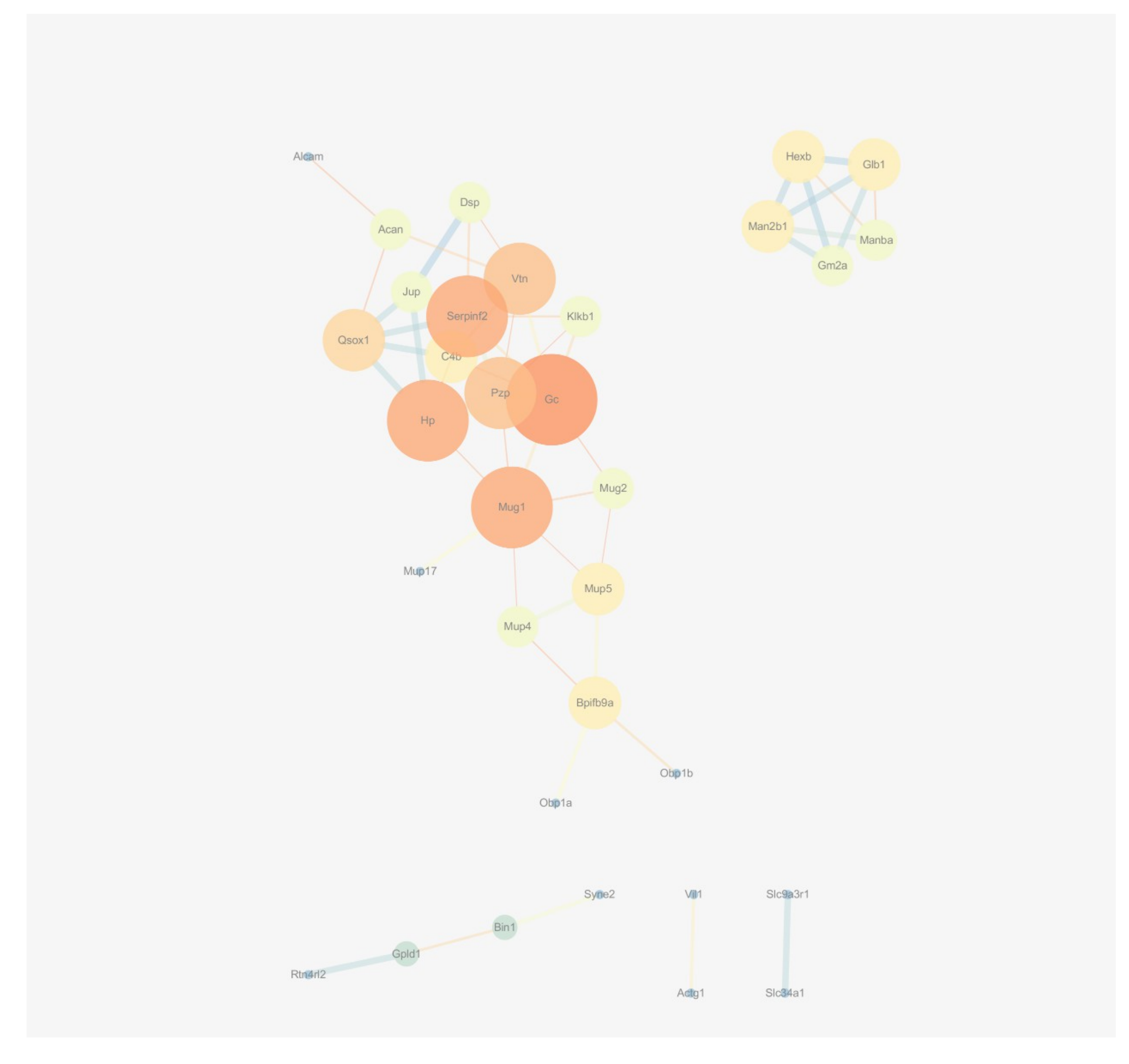


图 2.基因敲除 GeneA 组差异蛋白互作网络图。

对差异蛋白用 DAVID 数据库进行生物学过程富集，最终结果见图 3。结果

显示，基因敲除 GeneA 组小鼠主要在糖类的代谢、脂质的储存和消耗、蛋白质的代谢以及细胞形态的调节几方面产生了明显的变化。发生变化的生物学过程主要有葡萄糖代谢过程的正向调控、胰岛素分泌的负调节（参与细胞对葡萄糖刺激的反应）、葡萄糖生成的负调控、有氧呼吸、糖代谢平衡、碳水化合物代谢平衡、低聚糖的分解过程、细胞对脂质的反应、脂质代谢过程的正向调节、脂质生物合成过程的负向调控机制、储能代谢过程、细胞黏附、细胞形态的调节、产热等，共涉及到 31 种蛋白（包括 4 种主要尿蛋白）。

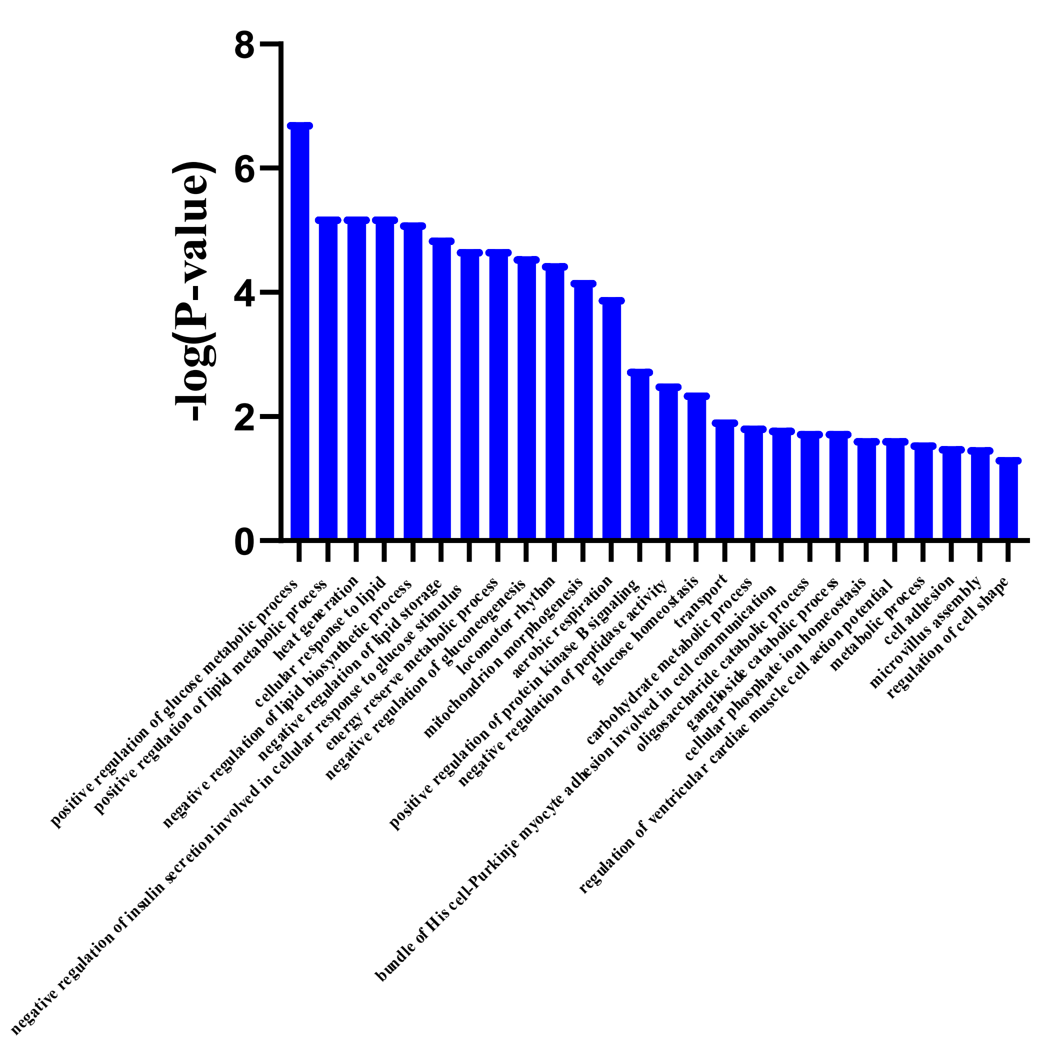


图 3.基因敲除 GeneA 组生物学过程。

2.3 GeneB 组小鼠尿液蛋白质组的变化

对于基因敲除 GeneB 组的小鼠，共收集实验组样本一组、对照组样本一组，每组样本以 DIA 模式采集数据三次。实验组样本平均鉴定到 510 种蛋白，对照组样本平均鉴定到 499 种蛋白，对比筛选出 65 种差异蛋白（表 2）。蛋白互作关系图（图 4）显示，Gapdh 基因与其他基因有着密切的联系。

表 2.基因敲除 GeneB 组差异蛋白。

UniProt Accession	Protein Name	Gene Name	Fold Change	P-value

Q91WR8	Glutathione peroxidase 6	Gpx6	13.21	0.0171
P10923	Osteopontin	Spp1	5.58	0.0131
Q9D7Z6	Calcium-activated chloride channel regulator 1	Clca1	3.58	0.0011
P15947	Kallikrein-1	Klk1	3.29	0.0116
Q64191	N(4)-(beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase	Aga	3.06	0.0216
O09159	Lysosomal alpha-mannosidase	Man2b1	3.01	0.0000
P07759	Serine protease inhibitor A3K	Serpina3k	2.93	0.0300
P10107	Annexin A1	Anxa1	2.67	0.0003
Q8K209	Adhesion G-protein coupled receptor G1	Adgrg1	2.64	0.0003
P18242	Cathepsin D	Ctsd	2.56	0.0005
G5E8Q8	Adhesion G protein-coupled receptor F5	Adgrf5	2.38	0.0007
P54818	Galactocerebrosidase	Galc	2.31	0.0007
Q9JLB4	Cubilin	Cubn	2.28	0.0052
Q7TMR0	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	Prcp	2.23	0.0001
P20060	Beta-hexosaminidase subunit beta	Hexb	2.10	0.0046
P41272	CD27 antigen	Cd27	2.09	0.0406
P28665	Murinoglobulin-1	Mug1	2.08	0.0081
P01635	Ig kappa chain V-V region K2	N/A	2.07	0.0043
P01680	Ig kappa chain V-IV region S107B	N/A	2.03	0.0031
Q3TCN2	Putative phospholipase B-like 2	Plbd2	2.00	0.0012
Q60928	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	Ggt1	0.49	0.0180
O09131	Glutathione S-transferase omega-1	Gsto1	0.49	0.0110
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	0.49	0.0011
P01027	Complement C3	C3	0.48	0.0009
Q02013	Aquaporin-1	Aqp1	0.48	0.0050
Q9JII6	Aldo-keto reductase family 1 member A1	Akr1a1	0.47	0.0087
P10605	Cathepsin B	Ctsb	0.47	0.0014
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	0.46	0.0022
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	0.46	0.0049
P16460	Argininosuccinate synthase	Ass1	0.46	0.0050
Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	Aldob	0.45	0.0011
Q61865	Melanoma-derived growth regulatory protein	Mia	0.44	0.0021
P11352	Glutathione peroxidase 1	Gpx1	0.44	0.0136
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	0.43	0.0003
Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	0.42	0.0007
P45376	Aldo-keto reductase family 1 member B1	Akr1b1	0.41	0.0290
Q60605	Myosin light polypeptide 6	Myl6	0.40	0.0051
O88844	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	0.40	0.0011
P63260	Actin, cytoplasmic 2	Actg1	0.40	0.0012
P51855	Glutathione synthetase	Gss	0.39	0.0039
P07361	Alpha-1-acid glycoprotein 2	Orm2	0.39	0.0020
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	Eef1a1	0.37	0.0023
P01942	Hemoglobin subunit alpha	Hba	0.36	0.0496
Q91V76	Ester hydrolase C11orf54 homolog	N/A	0.35	0.0033

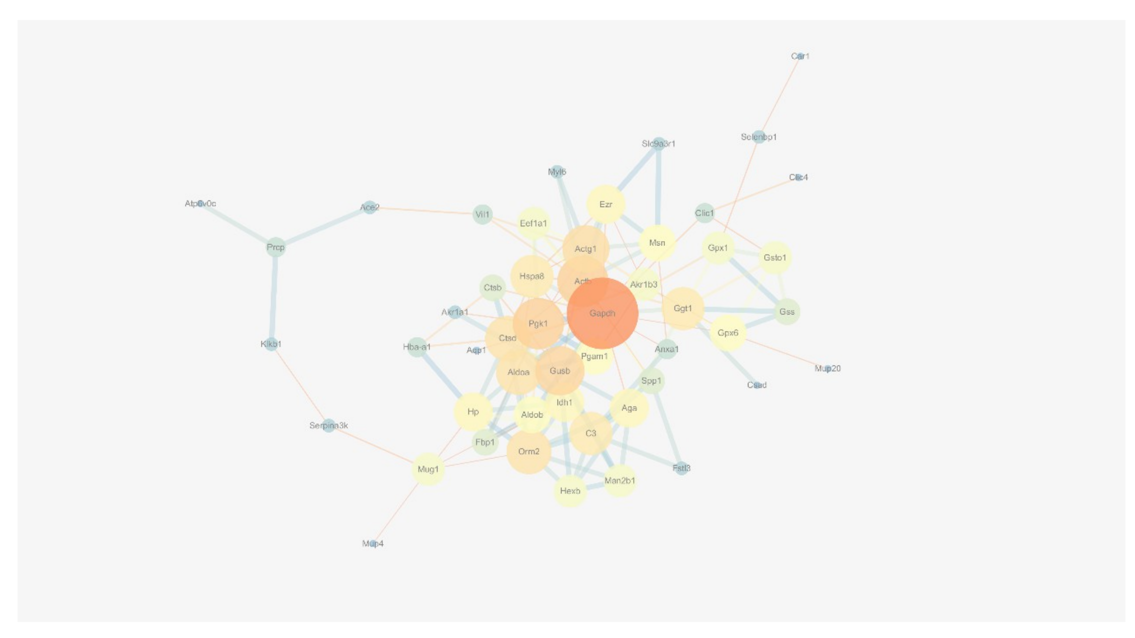


图 4.基因敲除 GeneB 组差异蛋白互作网络图。

对最终鉴定到的差异蛋白用 DAVID 数据库进行生物学过程富集，最终结果见图 5。生物学过程显示，基因敲除 GeneB 组小鼠主要在糖类的分解代谢、蛋白的分解代谢以及细胞形态的构造几方面产生了明显的变化。发生变化的生物学过程主要有糖酵解过程、细胞形状的调节、碳水化合物代谢过程、葡萄糖苷的生成、蛋白质分解、果糖代谢过程、谷胱甘肽代谢过程、血小板聚集、葡萄糖稳态、调节免疫系统、谷胱甘肽的生物合成过程等，共涉及到 43 种蛋白。

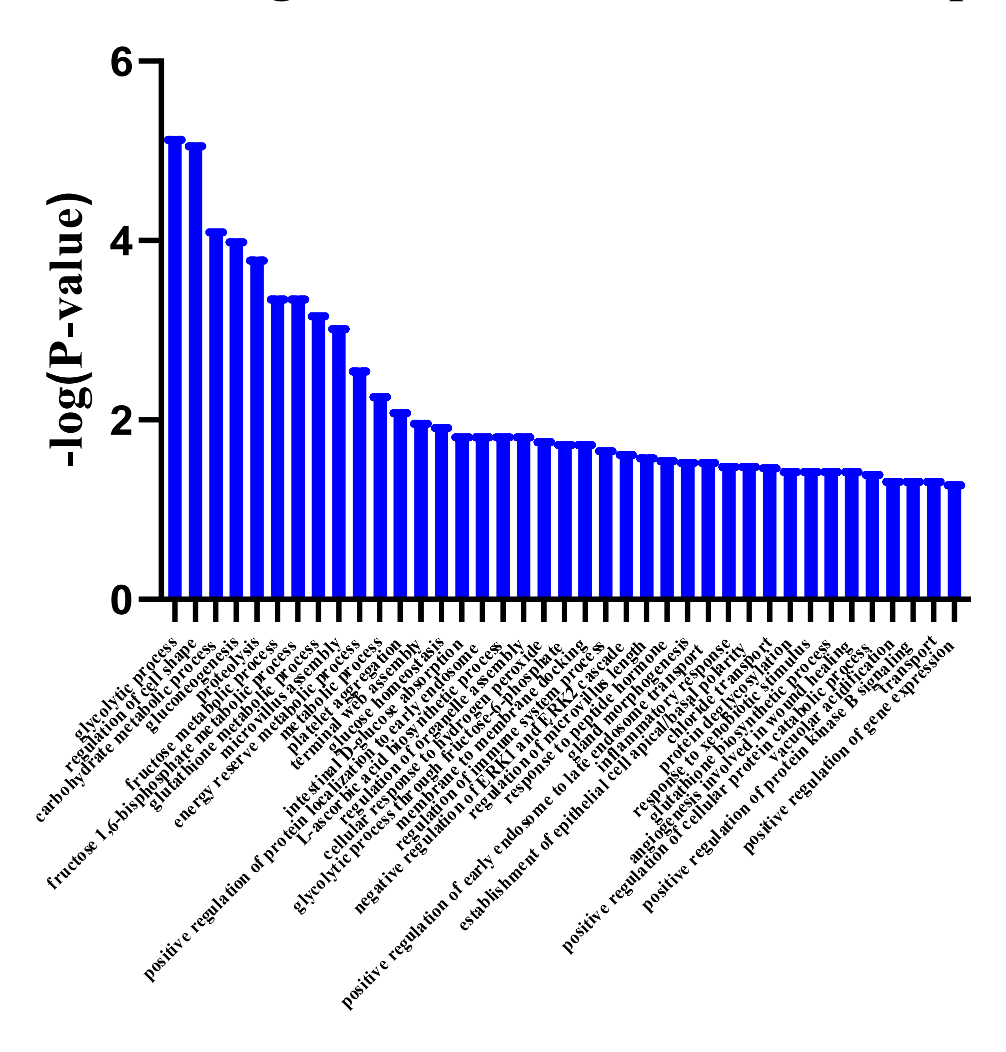


图 5.基因敲除 GeneB 组生物学过程。

讨论

就观察到的生物学过程而言，基因敲除 GeneA 组小鼠的糖代谢、脂质代谢过程发生了显著变化，但是这些生物学过程都是由主要尿液蛋白富集到的，主要尿蛋白有调控脂质代谢的作用，并且在小鼠尿液中相对丰度比较高，因而它们一旦发生变化，就会引起很多生物学过程的改变。

但除此之外，仍然富集到了多种分解代谢过程。与分解代谢相关的生物学过程包括葡萄糖代谢的正向调控、碳水化合物的代谢过程、神经节苷脂的分解过程、低聚糖的分解过程与新陈代谢过程，所涉及到的差异蛋白有 7 种。磷脂酰肌醇-多糖特异性磷脂酶 D（CPI-PLD）对葡萄糖代谢有正调控作用；溶酶体 α-甘露糖苷酶则是人体内糖蛋白降解途径之中的主要外糖苷酶，它参与糖蛋白的回收利用过程[11]；β-半乳糖苷酶参与乳糖的水解[12]；β-己糖胺酶是一种重要的溶酶体酶[13]；β-甘露糖苷酶能分解甘露聚糖，改善葡萄糖吸收[14]。

蛋白互作关系图显示，GeneA 组被敲除基因很可能是通过影响

Gc、Serpinf2、Hp 和 Mug1 四个基因来发挥作用的。Gc 编码维生素 D 结合蛋白，参与维生素 D 的运输和储存，清除细胞外 G-肌动蛋白，增强炎症和巨噬细胞激活中中性粒细胞 C5 α 的趋化活性。Serpinf2 编码 α-2-抗纤维蛋白溶酶，作为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂发挥作用。Hp 编码触珠蛋白，捕获并与游离血浆血红蛋白结合，使血红素铁在肝脏循环，防止肾脏损伤。触珠蛋白还作为一种抗氧化剂，具有抗菌活性，并在调节急性期反应的许多方面发挥作用。Mug1 编码鼠球蛋白 1，作为蛋白酶发挥作用。

糖类的分解代谢过程也是基因敲除 GeneB 组小鼠生物学过程变化最显著的过程，所涉及到的蛋白共有 10 种。PGAM1（磷酸甘油酸变位酶 1）在细胞周期检测点激酶 1 的协同下，对糖酵解过程进行调控[15]；GAPDH（甘油醛-3-磷酸脱氢酶）属于糖酵解酶，在它的下，催化 D-甘油醛-3-磷酸会转化为 1,3-二磷酸甘油酯[16]；ALDOA（果糖二磷酸醛缩酶 A）也是糖酵解之中的一个关键酶，它负责催化果糖-1,6-二磷酸可逆地转化为 3-磷酸甘油酯磷及酸二羟丙酮[17]；PHK1（磷酸甘油酸激酶 1）是糖酵解途径之中产生 ATP 的第一个关键酶，它不仅是一种代谢酶，也是蛋白激酶[18]; ALDOB（果糖二磷酸醛缩酶 B）也是糖酵解的关键酶之一；β-己糖胺酶是一种重要的溶酶体酶[13]；溶酶体 α-甘露糖苷酶则是人体内糖蛋白降解途径之中的主要外糖苷酶，它参与糖蛋白的回收利用过程[11]；FBP（果糖-1,6-二磷酸酶）-1 是一种糖化酶，可以调节 β 细胞的葡萄糖代谢和胰岛素分泌[19]；半乳糖苷酶水解含半乳糖苷键的物质；β-葡萄糖醛酸苷酶在多种葡萄糖醛酸苷被水解成为游离的苷元的过程中起关键作用[20]。

细胞形态的构造相关的生物学过程约有 14 个，涉及到的蛋白有 9 种。其中有两种与糖类的分解代谢也相关，分别是 ALDOA（果糖二磷酸醛缩酶 A）、ALDOB（果糖二磷酸醛缩酶 B）β-己糖胺酶亚单位 β。这两种蛋白都与细胞形状的调节这一生物学过程相关。ALDOA（果糖二磷酸醛缩酶 A）具有支架蛋白的功能；β-己糖胺酶亚单位 β 与调节细胞形状有关。此外，Villin-1 是肌动蛋白结合蛋白，调控肌动蛋白的变化，调节细胞应激反应；Moesin 是 ERM 蛋白家族成员，它将肌动蛋白丝以及微管连接到质膜上，以控制信号和调节细胞形态[21]；ANXA1（膜联蛋白 A1）是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白；Ezrin 蛋白与 Moesin 蛋白是一种交叉连接蛋白，连接顶膜蛋白以及肌动蛋白细胞骨架，均参与顶膜蛋白的功能表达[22]；Ezrin 蛋白是一种肌动蛋白细胞骨架的连接蛋白，可以调节肾脏之中的各种膜蛋白[23]。以这四种蛋白为主的蛋白共同参与细胞形态的调节、微绒毛长度的调节和组装、细胞器组装的调节、膜与膜的对接等过程，共同完成细胞形态的构造。蛋白质的代谢相关过程变化较显著，涉及 11 种蛋白，这些蛋白多为蛋白酶、肽酶及氨基酸酶。

蛋白互作关系图显示，GeneB 组被敲除基因很可能是通过影响 Gadph 发挥作用的，Gapdh 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶，是在糖酵解中的关键酶，也可调节细胞骨架的组织和组装。

结论

本研究通过对 GeneA 和 GeneB 两组基因敲除后无表型变化的小鼠与相应对照组小鼠尿液进行蛋白质组学分析，筛选差异蛋白并探究其影响的生物学过程，表明 GeneA 基因主要与糖类的分解代谢相关，GeneB 基因与糖类的分解代谢以及细胞形态的构造相关性比较密切，并对其可能发挥作用的机制进行了探索。表明尿液蛋白质组有区分不同基因敲除的无表型小鼠的潜力，可以通过尿蛋白质

组的变化为没有表型的基因修饰动物发现功能改变的线索，为相关研究提供了新的思路。

参考文献

[1]GAO YouHe.Urine—an untapped goldmine for biomarker discovery?[J].Science China(Life Sciences),2013,56(12):1145-1146.

[2]Yanying Ni,Fanshuang Zhang,Manxia An,Wei Yin,Youhe Gao. Early candidate biomarkers found from urine of glioblastoma multiforme rat before changes in MRI[J]. Science China Life Sciences,2018,61(8):

[3]Wei Jing,Meng Wenshu,Gao Youhe. Urine proteome changes in rats subcutaneously inoculated with approximately ten tumor cells.[J]. PeerJ,2019,7:

[4]孙久荣．脑科学导论：北京大学出版社，2001 年 12 月：14

[5]贺松,张德纯.基因敲除方法及其应用[J].中国微生态学杂志,2009,21(02):181-184.

[6]于鲁孟,刘思思,高晓冬,藤田盛久.基于细胞融合开发双基因共敲除技术[J].食品与生物技术学报,2021,40(01):65-74.

[7]Zhao Mindi,Li Menglin,Li Xundou,Shao Chen,Yin Jianrui,Gao Youhe. Dynamic changes of urinary proteins in a focal segmental glomerulosclerosis rat model.[J]. Proteome science,2014,12:

[8]Jacek R Wiśniewski,Alexandre Zougman,Nagarjuna Nagaraj,Matthias Mann. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods: Techniques for life scientists and chemists,2009,6(5):

[9]Paul Shannon,Andrew Markiel,Owen Ozier,Nitin S. Baliga,Jonathan T. Wang,Daniel Ramage,Nada Amin,Benno Schwikowski,Trey Ideker. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks[J]. Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003,13(11):

[10]Wang Shisheng,Zheng Wen,Hu Liqiang,Gong Meng,Yang Hao. MixProTool: A Powerful and Comprehensive Web Tool for Analyzing and Visualizing Multigroup Proteomics Data.[J]. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology,2018,25(10):

[11]孙怀昌,DonaldF.PATERSON,JohnH.WOLFE.人溶酶体 α-甘露糖苷酶 cDNA 的克隆与表达[J].中国生物化学与分子生物学报,1999(05):16-22.

[12]张莉,李庆章,田雷.β-半乳糖苷酶研究进展[J].东北农业大学学报,2009,40(07):128-131.

[13] Hermo L , Adamali H I , Mahuran D , et al. beta-Hexosaminidase immunolocalization and alpha- and beta-subunit gene expression in the rat testis and epididymis.[J]. Molecular Reproduction & Development, 2015, 46(3):227-242.

[14]崔栩,曹云鹤,李瑞国.β-甘露聚糖酶研究进展[J].中国畜牧杂志,2010,46(15):69-72.

[15]Mikawa Takumi,Shibata Eri,Shimada Midori,Ito Ken,Ito Tomiko,Kanda Hiroaki,Takubo Keiyo,Lleonart Matilde E.,Inagaki Nobuya,Yokode Masayuki,Kondoh Hiroshi. Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis[J]. iScience,2020,23(7).

[16]Kim Yong Ju. A cryoprotectant induces conformational change in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.[J]. Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications,2018,74(Pt 5).

[17]Sha Du,Zhuzhu Guan,Lihong Hao,Yang Song,Lan Wang,Linlin Gong,Lu Liu,Xiaoyu Qi,Zhaoyuan Hou,Shujuan Shao. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration.[J]. PLoS ONE,2017,9(1).

[18]Qi Fu,Zhenhai Yu. Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) in cancer: A promising target for diagnosis and

therapy[J]. Life Sciences,2020,256.
[19]Ye Zhang,Zhifang Xie,Luting Zhou,Ling Li,Hai Zhang,Guangdi Zhou,Xianhua Ma,Pedro L. Herrera,Zhimin Liu,Michael J. Grusby,Weiping J. Zhang. The Zinc Finger Protein ZBTB20 Regulates Transcription of Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 and β Cell Function in Mice[J]. Gastroenterology,2012,142(7).
[20]Bai Yue,Chen Lu,Cao YunFeng,Hou XuDong,Jia ShouNing,Zhou Qi,He YuQi,Hou Jie. Beta-Glucuronidase Inhibition by Constituents of Mulberry Bark.[J]. Planta medica,2021.
[21]Leguay Kévin,Decelle Barbara,He Yu Yan,Pagniez Anthony,Hogue Mireille,Kobayashi Hiroyuki,Le Gouill Christian,Bouvier Michel,Carréno Sébastien. Development of conformational BRET biosensors that monitor ezrin, radixin and moesin activation in real-time.[J]. Journal of cell science,2021.
[22]Kawaguchi Kotoku,Saito Daichi,Yasuoka Kasane,Asano Shinji. Roles of Ezrin in regulation of ciliary beating in lung multiciliated cell[J]. The FASEB Journal,2021,35.
[23]Gholam Mohammed,Alli Abdel. Phosphorylation of NCC and its Association with The Actin Cytoskeleton Linker Protein Ezrin in the Diabetic Kidney is Reduced by Dapagliflozin Treatment[J]. The FASEB Journal,2021,35.

作者贡献声明[i]：

高友鹤：提出研究思路，设计研究方案；
华元瑞，郭晓甜：进行实验；
华元瑞，郭晓甜：采集、清洗和分析数据；
郭晓甜，华元瑞：论文起草；
高友鹤：论文最终版本修订。

i